تطوير كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء باستعمال طريقة السمبلكس لتقدير بعض الادوية المضادة للاحتقان بصورة آلية

مؤمن فريد حمد السامرائي^{1*}، عماد طارق حنون¹، علي إبراهيم خليل²

1- قسم الكيمياء، كلية التربية، جامعة سامراء (believerpc@uosamarra.edu.iq)

2- قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة تكريت

البحث مستل من رسالة دكتوراه الباحث الاول

الخلاصة:

معلومات البحث:

باستعمال طريقة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء تم تقدير ثلاثة عقاقير مضادة للاحتقان الكلورفينيرامين ماليت (CPM) والباراسيتامول (Para) وهيدروكلوريد الفينيل فريين (PPH) بصورة آلية في المستحضرات الصيدلانية، الطريقة سريعة ودقيقة وحساسة، تم تحسين ظروف التشغيل التجريبية المختلفة للحصول على أحسن فصل وأقل وقت ممكن للتحليل باستعمال طريقتين وفي كلتا الطريقتين تم استعمال الازاحة الايزوكراتية وطور متحرك مكون من أسيتونتريل: محلول بفر مكون من [0.01] مولاري فوسفات ثنائي البوتاسيوم و فوسفات احادي البوتاسيوم ودرجة حرارة 38 درجة مئوية وطول موجي [228] نانومتر وحجم مادة محقون [20] ميكرو لتر وعمود فصل NUCLEODUR® C18 [250 × 4.6 mm i.d] ، الطريقة الأولى: طريقة المتغيرات الأحادية اذ تم من خلال هذه الطريقة تحسين ظروف التشغيل للوصول الى الظروف الفضلى ووجد علاوة الظروف أعلاه ان الدالة الحامضية [7.8] وسرعة جريان [1.0] مل/دقيقة ونسبة الطور المتحرك [50:50] أسيتونتريل: محلول بفر، اما الطريقة الثانية: طريقة المتغيرات المتعددة فقد تم تطوير طريقة HPLC باستعمال طريقة السمبلكس ووجد ان الدالة الحامضية الفضلى [7.7] وسرعة جريان [1.0] مل/دقيقة ونسبة الطور المتحرك [48:52] أسيتونتريل: محلول بفر ، وكانت النتائج مقاربة اذ بلغت الاسترجاعية [95.18- 105.00] بحد كشف وحد كمي [0.092- 0.301] مكغم/مل و[6.440- 2.107] مكغم/مل على التوالي.

تاريخ الاستلام: 2021/06/10

تاريخ القبول: 2021/07/20

الكلمات المفتاحية:

تطوير طريقة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء وطريقة السمبلكس والتقدير الآلي وعقاقير مضادة للاحتقان.

المقدمة:

يعد عقار الكلورفينيرامين ماليت CPM احد الادوية التي لا تستلزم وصفة طبية، وهو الجيل الاول من مضادات الهيستامين AHI التي تخفف معظم الاعراض المرتبطة بالتهاب الانف التحسسي او حمى القش، ويعمل كمهدئ خفيف مضاد للكوئين [1]. يسمى علميا حسب نظام IUPAC *N, N-dimethyl-3-pyridin-2-ylpropan-1-amin-4-chlorophenyl -N, Z-but-2-enedioic acid* وله التركيب الكيميائي الذي يمكن التعبير عنه كما في الشكل 1. ويعد عقار الباراسيتامول من الادوية المضادة للالتهابات غير الستيرويدية، ذا خصائص مسكنة وخافضة للحرارة يستخدمه البشر على نطاق واسع لتقليل الحمى والالام، وبعد من الادوية الاكثر استخداما والمتاح بدون وصفة طبية في جميع انحاء العالم، ويبلغ انتاجه اكثر من 100000 طن سنوياً [2-3]، ويسمى علمياً *N[4-hydroxy[1,2,3,4,5,6-13C6] cyclohexa-1,3,5-trien-1-yl] acetamide*، والشكل 2 يبين تركيبه الكيميائي، اما عقار هيدروكلوريد الفينيل فريين فهو من المنبهات الأدرينالية المستخدم بشكل اساس مزيلا للاحتقان ولتوسيع حدة العين ولزيادة ضغط الدم، ويتم تسويق الفينيل فريين كبديل للسودايفيردين (دواء مضاد للاحتقان)، ومن الجدير بالذكر ان الفينيل فريين قد يسبب انخفاضاً في ضربات القلب [4]، ويسمى نظامياً (3)-[1-ethyl phenol; hydrochloride 1]-[2-methylamino]-[1-hydroxy-2-R]

والشكل 3 يبين التركيب الكيميائي للعقار.

الشكل [1]: التركيب الكيميائي لعقار الكلورفينيرامين ماليت. **الشكل [2]:** التركيب الكيميائي لعقار الباراسيتامول. **الشكل [3]:** التركيب الكيميائي لعقار هيدروكلوريد الفينيل فرين.

ولأهمية هذه العقاقير من الناحية الطبية وكثرة استخدامها تم تقديرها بطرائق تحليلية مختلفة، فقد تم استخدام طريقة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء لتقدير هذه العقاقير [10-5] والطرائق الطيفية [11-16] والطرائق الكهربية [17-22].

ان الهدف من البحث الحالي هو تطوير طريقة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء بطريقة السبيلكس لتقدير هذه العقاقير سوية في مستحضرات صيدلانية بشكل آني وبصورة سهلة وسريعة ودقيقة.

المواد وطرائق العمل

الاجهزة

- جهاز HPLC نوع Shimadzu, Kyoto, Japan.
- ميزان حساس من نوع Sartorius BL 210 S الماني الصنع.
- حمام الموجات فوق الصوتية من طراز KARL KOLB [تردد 40 كيلو هرتز] موديل [D-6072 Germany]
- جهاز قياس الدالة الحامضية نوع OHAUS.

المحاليل

جميع المذيبات المستخدمة في هذه الدراسة كانت [HPLC grade] وتم الحصول عليها مع بقية المواد من الشركة العامة لصناعة الادوية والمستلزمات الطبية- سامراء [SDI].

المحاليل القياسية

تم تحضير 1000 مكغم. مل⁻¹ من اذابة 0.1 غم من CPM و Para و PPH كلا على حدة في كمية من الطور المتحرك ثم أكمل الحجم الى حد العلامة من نفس المذيب في قنينة حجمية سعة 100 مل.

المحاليل المستعملة في العمل

تم تحضير [~ 0.01 مولاري] من كل من فوسفات ثنائي البوتاسيوم وفوسفات أحادي البوتاسيوم وحامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم من اذابة 1.7490 غم و 1.3609 غم و 8.5 مل و 4 غم من المواد المذكورة على التوالي، في كمية مناسبة من الماء المقطر وأكمل الحجم بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 1000 مل.

محاليل المستحضرات الصيدلانية

تم تحضير محلول ذو تركيز [250µg.mL⁻¹ Para, 5µg.mL⁻¹ PPH and 2µg.mL⁻¹ CPM] من كل مستحضر صيدلاني أقرص تم العمل عليه، وذلك بعد اخذ معدل وزن حبة ثم اذابتها بالطور المتحرك مستخدما قنينة حجمية مناسبة، اما المستحضر الصيدلاني شراب فمنه حضر محلول ذو تركيز [PPH and 125µg.mL⁻¹ Para, 5µg.mL⁻¹] CPM 1µg.mL⁻¹، الجدول 1 يبين المستحضرات الصيدلانية التي استخدمت:

جدول 1: المستحضرات الصيدلانية المستخدمة.

Pharmaceutical preparation	Content	Company
Dolo-cold/ Tablets	500mg Para, 10mg PPH & 4mg CPM	MICRO LABS (India)
STOP IT/ Tablets	500mg Para, 10mg PPH & 4mg CPM	Hightech Healthcare (India)
HICOLD/ Tablets	500mg Para, 10mg PPH & 4mg CPM	BRAUN (India)
V- COLD/ Syrup	125mg Para, 5mg PPH & 1mg CPM	Vassil (India)

وللتخلص من الشوائب استخدمت ورقة ترشيح Whatman رقم 40، حتى تصبح المحاليل المجهزة والمستخدمه رائقة وقابلة للقياس.

طريقة العمل

بعد اجراء تجارب عديدة أجريت بهدف الوصول لفصل مقبول تم اجراء تغييرات عديدة بظروف التجربة، اذ تم استخدام [90:10] أسيتونتريل: مزيج من فوسفات ثنائي البوتاسيوم وفوسفات احادي البوتاسيوم [pH=6.85] كطور متحرك باستخدام ظروف أولية كالحرارة عند 25 درجة مئوية وطول موجي 225 نانومتر وسرعة جريان 0.8 مل/دقيقة، ويتبين من الكروماتوغرام الذي تم الحصول عليه [الشكل4] إمكانية استخدام هذه الظروف الابتدائية بعد اختيار أفضلها لفصل مزيج العقاقير قيد الدراسة في اشكالها النقية والصيدلانية، وتم تسجيل زمن الاحتجاز وارتفاع ومساحة القمة حسب مامبين في الجدول 2.

الشكل 4: كروماتوغرام لمزيج من العقاقير بتركيز 5مايكروغرام/مل من كل عقار تحت ظروف أولية.

جدول (2): زمن الاحتجاز ومساحة وارتفاع القمم.

Peak	Retention time (t _R) min.	Area (mV.sec)	Height (mV)
1	1.728	736683	119813
2	2.439	2828908	474717
3	7.130	780281	19787

ومن أجل معرفة تسلسل كل عقار في المخطط الكروماتوغرامي الناتج في الشكل [4] اعلاه، تم حقن [50] مايكروغرام/مل من كل عقار بشكل فردي تحت نفس ظروف التشغيل وسجل زمن الاحتجاز. تظهر النتائج أن تسلسل اراحة العقاقير كان بالترتيب الآتي CPM أولا ثم Para وأخيرا PPH، وحسب ما مبين في الشكل [5].

الشكل 5: كروماتوغرام فصل العقاقير CPM وPara وPPH.

وتم تحسين ظروف التشغيل التجريبية المختلفة للحصول على أحسن فصل وأقل وقت ممكن للتحليل. تمت دراسة تحسين المتغيرات المؤثرة، وباستخدام الازاحة الايزوكراتية isocratic elution مكونات الطور المتحرك تكون ثابتة خلال فترة الاسترداد ، باستخدام مزيج من العقاقير الثلاثة تشمل 50 ميكروغرام/مل من كل منها. ولهذا الغرض تم استعمال طريقتين هما:

• طريقة المتغيرات الأحادية

من خلال هذه الطريقة تم ضبط الظروف الفضلى لعدد من الظروف التجريبية المؤثرة على فصل العقاقير وفيما يأتي الظروف التي تم دراسة تأثيرها على فصل العقاقير قيد الدراسة:

1- تأثير الطول الموجي

تم اختبار الطول الموجي المؤثر على فصل مزيج العقاقير قيد الدراسة باختبار الظروف التجريبية الأولية.

2- تأثير مكونات الطور المتحرك

اختيار الازاحة الايزوكراتية isocratic elution المناسبة بدراسة تركيبات مختلفة من الطور المتحرك الاسيتونتريل: محلول منظم مكون KH_2PO_4 & K_2HPO_4 وبنسب [90:10] و [80:20] و [70:30] و [60:40] و [50:50] و [40:60] و [30:70] و [20:80] و [10:90].

3- تأثير سرعة جريان الطور المتحرك

تم دراسة تأثير سرعة جريان الطور المتحرك (الاسيتونتريل: محلول منظم مكون KH_2PO_4 and K_2HPO_4 على فصل الأدوية الثلاثة المذكورة عن طريق تغيير سرعة الجريان من [0.5] إلى [1.4] مل/دقيقة.

4- تأثير نوع عمود الفصل

تم دراسة تأثير نوع عمود الفصل على فصل العقاقير الثلاثة لاختيار أفضل عمود فصل.

5- تأثير الحجم المحقون حجم النموذج

تم حقن أحجام عينات مختلفة [5 – 30] ميكرو لتر لمزيج العقاقير بتركيز [50 ميكروغرام/مل] من CPM و Para و PPH.

6- تأثير درجة الحرارة

تمت دراسة تأثير تغيير درجة حرارة العمود على فصل مزيج [50 ميكروغرام/مل] من CPM و Para و PPH للمدى [25-50] درجة مئوية.

7- تأثير الدالة الحامضية

من أجل تحسين نوعية الفصل تم دراسة تأثير الدالة الحامضية للطور المتحرك على كفاءة الفصل باستخدام (الاسيتونتريل: محلول منظم مكون KH_2PO_4 & K_2HPO_4 كطور متحرك).

• طريقة دراسة المتغيرات المتعددة

تم تطوير طريقة كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء باستخدام طريقة Simplex؛ إذ اختبرت ثلاثة متغيرات مؤثرة في التفاعل وهي سرعة جريان الطور المتحرك والدالة الحامضية والمكون العضوي المكون للطور المتحرك Acetonitrile، وبهذه الطريقة تم الوصول الى الظروف الفضلى لكل منها. يشير الجدول 3 الى الحدود الدنيا والحدود العليا لكل من المتغيرات المدروسة فضلا عن قيمة التغير المطلوب اجراءه في قيمة كل متغير اثناء الدراسة step size التي تم اختيارها بالاعتماد على دراستنا السابقة لطريقة HPLC.

جدول (3): حدود السيلكس للمتغيرات قيد الدراسة.

Variable	Range for Drugs mix.	Step size
Flow rate	0.5-1.4	0.3
pH	4.8-9.8	1.0
Organic phase	10-90	10

ولعمل Simplex تم اختيار اربعة تصميمات لتجارب [مساوٍ لـ $n+1$] بشكل غير منتظم لكن تكون قيم المتغيرات ضمن الحدود المعمول بها والمبينة في الجدول [3] ويجب انجازها لتغطي اوسع مجال يظهر تأثير كل متغير بشكل واضح في النتائج. ان التجارب الاربعة المبينة في الجدول 4 انجزت على ما تم ذكره وأدخلت النتائج المستحصلة منها الى برنامج حاسوب متخصص يعمل على وفق نظام Simplex، ان هذه النتائج المدخلة الى البرنامج هي التي تعين اتجاه حركة Simplex من التمدد او الانكماش في اثناء استكشافه مجموعة جديدة من الظروف التجريبية.

جدول (4): التصميم التجريبي (n+1) للمتغيرات التي درست.

Drugs mix.	Exp. No.	Flow rate	Organic phase	pH	N*
CPM, Para & PPH	1	0.8	43	5.9	7985
	2	1.0	50	6.8	8045
	3	1.0	52	7.7	8109
	4	1.2	80	6.6	8011

* Total efficiency for three drugs.

النتائج والمناقشة

1- اختيار الطول الموجي

للتوصل الى الطول الموجي المناسب الذي عنده يتم الكشف عن العقاقير CPM و Para و PPH، تم تحضير محلول [50 ميكروغرام/مل] لكل من هذه المركبات في الطور المتحرك كمذيب، تم مسح كل محلول بواسطة مقياس الطيف الضوئي المرئي للأشعة فوق البنفسجية لمدى [200-400] نانومتر، أظهرت أطيف الأشعة فوق البنفسجية المتداخلة أن العقاقير تظهر قيم امتصاص معقولة ومتساوية تقريباً عند [225] نانومتر والذي تم استخدامه في الاختبارات الأولية، الشكل [6] يبين طيف الامتصاص لكل عقار مقابل الطور المتحرك المستخدم كبلانك.

الشكل 5: طيف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية للعقاقير الثلاثة.

2- تحسين المتغيرات التجريبية

• طريقة المتغيرات الأحادية

1- تأثير الطول الموجي

ان اختيار الطول الموجي الأفضل يعتمد على الاستجابة الذروة فكلما كانت جيدة من حيث قدرة الفصل وعامل عدم تماثل الطيف والكفاءة عدد الصفائح النظرية وضمن المدى الخطي الخاص بالمكشاف يكون هو الطول الموجي الأفضل، ويجب ان يتم اختيار الطول الموجي الذي يمثل الطول الموجي الاعظم λ_{max} اذ ان هذا يقلل من التداخل الطيفي الناتج عن خطأ القياس للكاشف نفسه، ويؤدي اختيار λ_{max} إلى زيادة حساسية الطريقة إلى أقصى حد، وعندما يتم تحديد مزيج بصورة انية بنفس التجربة يجب أيضاً إعطاء الأولوية للطول الموجي الذي تمتص فيه الجزيئات بشكل مقبول والبحث عن مناطق متكافئة في الأطياف، اما إذا اختير أقصى امتصاص لمادة واحدة وتم تجاهل امتصاص المواد الأخرى فلن يكون القياس الكمي دقيقاً [24,23].

من خلال ملاحظة الطيف وجد ان الاطياف المتكافئة تتراوح بين تقريباً [220-232] نانومتر فلذا تم اختيار أربعة اطوال موجية تقع ضمن هذا المدى وهي [220 و 224 و 228 و 232 نانومتر]، والجدول 5 يبين ان الطول الموجي الأفضل هو [228] نانومتر من حيث قدرة الفصل وعدم تماثل الاطياف الثلاثة للعقاقير وكذلك عدد الصفائح النظرية، والشكل 7 يبين الكروماتوغرامات لهذه الدراسة.

جدول (5): الطول الموجي الافضل

Wavelength nm.	Drug	Parameter		
		R_s^*	N	A_s^{**}
220	CPM	1.020	1486	1.225
	Para	1.042	3292	0.934
	PPH	1.254	0664	1.163
224	CPM	1.031	1491	1.195
	Para	1.011	3302	0.932
	PPH	1.258	0684	1.233
228	CPM	1.091	1527	0.941
	Para	1.134	3489	0.845
	PPH	1.298	0734	1.012
232	CPM	1.145	1515	0.961
	Para	1.118	3482	0.821
	PPH	1.237	0723	1.053

*The overlap $\leq 2\%$ when R_s is > 1.25 , While when $R_s = 1.5$ the overlap is $\leq 0.2\%$. $R = (N)^{0.5}/4 \times (K'b/1+K'b) (\alpha-1/\alpha)^{(1/5)}$.
 ** $A_s < 1$: fronting. $A_s = a/b$.

الشكل 7: تأثير الطول الموجي على فصل العقاقير الثلاثة (CPM و Para و PPH).

1- تأثير مكونات الطور المتحرك

لا يمكن استخدام الماء النقي على أعمدة كروماتوغرافيا RP دون إضافة معدل عضوي، وبشكل عام يعد الميثانول والأسيتونتريل ورباعي الهيدرو فيوران بدرجة أقل أكثر المعدلات شيوعاً في الطور المتحرك لهذه الأنظمة [25].

تم تجربة اثنين من المعدلات العضوية المختلفة وهما الميثانول والأسيتونتريل للدراسة احتجاز العقاقير، فأظهرت الدراسة فرقاً واضحاً في فصل الأدوية عندما تباينت تركيبة الطور المتحرك من [50:50]

ميثانول: محلول منظم إلى [50:50] أسيتونتريل: محلول منظم، إذ أعطى استخدام الاسيتونتريل فصل مقبول عند استخدامه معدلاً ويمكن أن يُعزى هذا إلى حقيقة أن هذا المركب لديه قدرة قليلة على تكوين الرابطة الهيدروجين وعادة ما يكون له تأثير على الذوبان من الميثانول وعزم ثنائي القطب العالي الذي يمكنه من المشاركة في تفاعل انتقالي ثنائي القطب مع مواد مذابة معينة [26]. فضلاً عن ذلك فإن خلأط الاسيتونتريل- الماء لها لزوجة أقل بحوالي 2.5 مرة من خلأط الميثانول والماء وهذا يتيح استخدام 2.5 سرعة جريان أسرع مع الاسيتونتريل كمعدل عضوي وبالتالي فصل أسرع [27].

تم التوصل الى التركيب الأمثل للطور المتحرك ليكون [50:50] أسيتونتريل: محلول منظم جدول [6] والذي يعطي فصلاً نظيفاً خالياً من التشوهات وقدرة فصل جيدة عند طول موجي أمثل [228] نانومتر. ان قيم R_s لكل عقار تتغير بشكل مستقل مع تغير النسبة المئوية للمعدل في الطور المتحرك مما يسهل اختيار النسبة الأمثل، والشكل [8] يمثل العلاقة بين نسبة الطور العضوي وقدرة الفصل مع الكفاءة.

الشكل (8): تأثير تركيبة الطور المتحرك على فصل العقاقير

الجدول (6): قيم t_R و R_s و N حسب تركيب الطور المتحرك.

Mobile phase (v/v) Acetonitrile: buffer solution	Drug	Parameter		
		t_R	R_s	N
10: 90	CPM	2.599	1.296	3072
	Para	4.134	1.377	6040
	PPH	6.812	1.479	1024
20: 80	CPM	2.123	0.000	2701
	Para	3.335	1.361	5272
	PPH	5.077	1.972	1352
30: 70	CPM	2.457	1.324	2588
	Para	3.857	1.202	2827
	PPH	5.301	1.423	0811
40: 60	CPM	1.851	1.261	2204
	Para	3.033	1.181	2892
	PPH	3.760	1.273	2360
50: 50	CPM	2.201	1.276	2025
	Para	3.327	1.417	4793
	PPH	5.095	1.329	3712
60: 40	CPM	3.310	1.115	2031
	Para	3.453	1.106	4179
	PPH	5.401	1.114	2416
70: 30	CPM	2.333	0.000	1654
	Para	3.301	1.937	4179
	PPH	5.958	1.231	3670
80: 20	CPM	2.298	0.000	1318
	Para	3.231	1.939	3597
	PPH	7.163	1.577	3204
90: 10	CPM	1.728	0.000	1491
	Para	2.438	1.179	3462
	PPH	7.125	1.154	0664

2- تأثير سرعة جريان الطور المتحرك

الهدف من اختيار سرعة الجريان المثلى هو الحصول على وقت تحليل قصير ومنع انتشار المذاب، مما يؤدي بدوره إلى كفاءة عالية للعمود [28]. سرعة جريان الطور المتحرك له تأثير مهم على زمن الاحتجاز للمادة المراد فصلها، وتؤدي سرعة جريان العالية إلى زمن احتجاز أقل لأن الأدوية تتحرك عبر العمود بشكل أسرع بعد الامتصاص والعكس صحيح. يوضح الشكل 9 الأشكال الكروماتوغرافية التي تم الحصول عليها عند تغيير سرعة جريان الطور المتحرك من 0.5 إلى 1.4 مل/دقيقة مما

يؤدي إلى تقليل وقت التحليل من 7.5 إلى 2.7 دقيقة. الجدول 7 يبين زمن الاحتجاز والدقة والكفاءة. تم اختيار سرعة جريان 1 مل/دقيقة ليكون الأمثل لإعطائه قيم أفضل من حيث قدرة الفصل والكفاءة وأيضاً زمن احتجاز قصير.

الشكل (9): الكروماتوغرامات عند تغيير سرعة جريان الطور المتحرك (a) 0.5 ml/min , (b) 0.8 ml/min , (c) 1.0 ml/min, (d) 1.2 ml/min and (e) 1.4 ml/min .

الجدول (7): قيم t_R , R_s and N حسب سرعة الطور المتحرك.

Flow rate (mL.min ⁻¹)	Drug	Parameter		
		t_R	R_s	N
0.5	CPM	3.488	1.944	2628
	Para	5.262	1.375	4187
	PPH	7.556	2.012	2032
0.8	CPM	2.212	0.000	2421
	Para	3.342	1.393	4232
	PPH	4.761	1.994	2318
1.0	CPM	1.791	1.289	2193
	Para	2.698	1.396	4540
	PPH	3.872	2.024	2619
1.2	CPM	1.496	0.000	1965
	Para	2.258	1.386	3429
	PPH	3.243	2.025	2371
1.4	CPM	1.270	0.000	1850
	Para	1.920	0.000	3232
	PPH	2.727	2.241	2098

3- تأثير نوع عمود الفصل

يتم تحسين الفصل الكروماتوغرافي عن طريق تغيير الظروف التجريبية حتى يتم فصل مكونات الخليط في أقل وقت ممكن، وإحدى هذه الظروف هو نوعية عمود الفصل الذي يمثل الركيزة الأساسية في عملية الفصل [24]. ومن خلال ملاحظة الكروماتوغرامات في الشكل 10 يتبين أن العمود الأفضل للفصل هو C18 250mm بعد تطبيق الظروف الفضلى في الفقرات السابقة.

الشكل (10): تأثير نوع العمود على عملية الفصل.

4- تأثير الحجم المحقون

يتم تحديد الحجم المحقون وفقاً لعدد من العوامل، بما في ذلك نوع الجهاز وحساسية الكاشف وسعة التحميل في العمود وتأثير مذيب العينة على شكل الذروة، وقد تؤدي الأحجام الصغيرة جداً إلى مشاكل في حساسية الكاشف أو فقدان العينة في العمود الكروماتوغرافي، بينما قد تؤثر الأحجام الكبيرة جداً على شكل الذروة (واسعة أو ذات قمة مسطحة أو تكون غير متماثلة) الذي يؤثر على الفصل [29]. تمت دراسة تحسين الحجم المحقون في تحليل CPM, Para and PPH على مدى (5-20) ميكرو لتر (الشكل 11). تم اختيار 20 ميكرو لتر ليكون أفضل حجم محقون لأنه يعطي أعلى مساحة وارتفاع قمة (الجدول 8) ويوضح الشكل (12) العلاقات الخطية الجيدة في كل من القياس بمساحة القمة والقياس بأسلوب ارتفاع القمة.

الشكل (11): مخطط كروماتوغرام نموذجي متراكب لثلاثة عقاقير بقيم مختلفة للحجم المحقون (5 و 10 و 15 و 20 ميكرو لتر).

الجدول (8): قيم مساحة وارتفاع القمة وزمن الاحتجاز لكل عقار عند حجوم مختلفة للنموذج.

Injected volume (μL)	Drug	t _R	Peak area (mV.sec)	Peak height (mV)
5	CPM	1.790	14404.13	7529.167
	Para	2.693	19068.17	1078.333
	PPH	3.874	15698.33	2452.667
10	CPM	1.779	234808.3	46058.33
	Para	2.684	393136.3	79956.67
	PPH	3.873	263396.7	22005.33
15	CPM	1.784	469616.5	81175
	Para	2.688	809409	173870
	PPH	3.869	490190	42716
20	CPM	1.794	709233	121525
	Para	2.695	1228227	261610
	PPH	3.877	750570	65148

الشكل (12): (a) العلاقة بين مساحة القمة كدالة للحجم المحقون، (b) العلاقة بين ارتفاع القمة كدالة للحجم المحقون { لكل عقار.

5- تأثير درجة الحرارة

تمت دراسة تأثير درجة حرارة العمود ضمن المدى من 28 إلى 48 درجة مئوية من خلال الكفاءة وقدرة الفصل وزمن الاحتجاز للعقاقير الجدول 9، والشكل (13) يوضح الكروماتوغرام الناتج من تأثير التغير في درجة حرارة العمود. وجد ان درجة الحرارة الفضلى 38 درجة مئوية.

الشكل (13): مخطط كروماتوغرام نموذجي مترابك لثلاثة عقاقير عند درجات حرارة مختلفة.

الجدول (9): قيم قدرة الفصل والكفاءة وزمن الاحتفاظ لكل عقار بـقيم مختلفة لدرجة الحرارة.

Temperature °C	Drug	t _R	R _s	N
28	CPM	1.799	0.000	2053
	Para	2.777	1.498	4254
	PPH	3.915	1.954	2074
33	CPM	1.771	0.000	2061
	Para	2.709	1.453	3712
	PPH	3.844	1.980	2212
38	CPM	1.781	1.461	2096
	Para	2.695	1.417	3800
	PPH	3.817	1.987	2154
43	CPM	1.776	1.520	2046
	Para	2.670	1.244	3768
	PPH	3.785	1.705	2142
48	CPM	1.764	1.267	2073
	Para	2.641	1.166	3800
	PPH	3.748	1.542	2271

6- تأثير الدالة الحامضية

تم دراسة تأثير الدالة الهيدروجينية لاختيار أفضلها من أجل بناء منحني المعايرة، بينما بقيت العوامل التجريبية الأخرى ثابتة، ويرجع سبب دراسة الدالة الحامضية والتي تراوحت بين (4.8-9.8) هو لضمان الحصول على نتائج ذات تكرارية عالية [30]. من الجدول (10) نلاحظ أن أفضل دالة هيدروجينية للطور المتحرك كانت 7.8 التي أعطت تكرارية عالية لزمن الاحتجاز والكفاءة الأفضل.

الجدول (10): قيم الكفاءة وزمن الاحتجاز لكل عقار بـقيم مختلفة للدالة الحامضية.

pH	Drug	t _R *				N*			
4.8	CPM	1.761	1.768	1.758	1.766	2043	2051	2048	2049
	Para	2.653	2.746	2.694	2.598	3294	3302	3282	3288
	PPH	3.652	3.667	3.646	3.657	2075	2070	2079	2118
6.8	CPM	1.826	1.833	1.829	1.899	2083	2078	2089	2082
	Para	2.706	2.727	2.747	2.709	3275	3280	3262	3279
	PPH	3.389	3.392	3.380	3.388	2466	2466	2472	2461
7.8	CPM	1.781	1.782	1.781	1.780	2099	2098	2098	2097
	Para	2.695	2.695	2.693	2.694	3800	3802	3802	3803
	PPH	3.817	3.818	3.817	3.817	2160	2161	2162	2161
8.8	CPM	1.776	1.777	1.776	1.779	2058	2056	2060	2059
	Para	2.670	2.674	2.680	2.677	3782	3789	3778	3783
	PPH	3.785	3.791	3.788	3.781	2132	2138	2129	2134
9.8	CPM	1.754	1.766	1.759	1.770	2088	2091	2087	2078
	Para	2.541	2.553	2.548	2.546	3785	3786	3785	3787
	PPH	3.758	3.755	3.753	3.761	2293	2298	2289	2277

* Average of four replicates.

• طريقة دراسة المتغيرات المتعددة

طريقة السمبلكس

استعملت طريقة السمبلكس لتثبيت الظروف التجريبية لفصل وتقدير العقاقير الثلاثة قيد الدراسة عن طريق استعمال تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء ومقارنة النتائج مع تلك المستحصلة بطريقة المتغير الأحادي (الاعتيادية). فقد تم في هذه الطريقة إيجاد الظروف الفضليات لثلاثة متغيرات (n=3) هي الدالة الحامضية سرعة الجريان ونسبة الطور العضوي في حين ثبتت باقي الظروف على وفق ما تم الحصول عليه سابقاً. ولأجل إيجاد الظروف الفضليات بطريقة السمبلكس تم تثبيت حدود تغير كل من المتغيرات قيد الدراسة (جدول 2-5)، وأجريت أربع تجارب (n+1) بشكل عشوائي وذلك باختيار قيم للمتغيرات تقع ضمن الحدود المقررة لكل متغير وتكون مؤثرة في قيمة الاستجابة (الكفاءة)، الجدول (3).

تمثل النقاط 1-4 الموجودة في الجدول (11) التجارب الأربعة الأولى مع قيم الامتصاص المقاسة لها، وبعد تغذية برنامج السمبلكس الخاص بهذه القيم يبدأ بعكس النقطة ذي النتيجة الأسوأ خلال المركز المتوسط (centroid) للنقاط الأخرى لينتج النقطة 5 الجديدة. ولأجل استمرار العمل بالبرنامج انجزت تجربة جديدة حسب الظروف المقترحة في النقطة 5، وتغذية البرنامج بالنتيجة المستحصلة منها، ولكون هذه النتيجة أفضل من تلك الخاصة بالنقطة 4 فقد أهملت هذه النقطة واستبدلت بالنقطة رقم 5. وهكذا يقوم البرنامج باقتراح نقطة جديدة في كل مرة ويتم

انجاز التجربة الخاصة بها وتغذية البرنامج بالنتيجة وتستمر العملية لحين الوصول الى الظروف الفضليات، وكانت هذه الدراسة تقريبا مماثلة لتلك التي تم الحصول عليها بالطريقة التقليدية.

الجدول (11): نتائج دراسة المتغيرات المتعددة (السملكس) لتقدير (50 ميكرو غرام/مل) لكل عقار في المزيج.

Exp. No.	Flow rate	Organic phase	pH	N*
1	0.8	43	5.9	7985
2	1.0	50	6.8	8045
3	1.0	52	7.7	8109
4	1.2	80	6.6	8011
5	1.0	50	6.0	8039
6	0.8	55	6.9	8043
7	1.0	40	7	8018
8	0.8	48	7.4	8089
9	1.0	65	7.4	7857
10	0.8	50	8	8099
11	1.0	58	7	8098
12	0.8	60	6.9	8022
13	1.3	45	5.5	7466
14	0.6	50	6.9	7889
15	0.8	40	7.8	8088

* Total efficiency for three drugs.

2- منحنيات المعايرة

وفقاً للظروف التجريبية المثلى، تم اختبار الخطية في مدى التركيز (0.1-500) ميكرو غرام/مل لمزيج من CPM و Para و PPH).

تم بناء منحنيات معايرة منفصلة لجميع الأدوية الثلاثة عن طريق رسم مساحة القمة وارتفاع القمة مقابل التراكيز الخاصة بها حسب ما موضح في الشكل (14) ووجد ان كل من عقار (CPM & PPH) الخطية لهما بحدود (0.1- 400 ميكرو غرام/مل) بينما كانت الخطية لعقار (Para) ضمن المدى (0.1- 350 ميكرو غرام/مل). الجدول (12) يبين معادلة الانحدار والارتباط الخطي وحد الكشف (LOD) والحد الكمي (LOQ).

الجدول (12): نتائج منحنيات المعايرة للعقاقير المنفصلة في ظل الظروف الفضليات بتقنية

HPLC

Drug	Linearity ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Response	r^2	Slope	Intercept	LOD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
CPM	0.1-400	Peak area	0.9994	16380	49251	0.283	0.934
		Peak height	0.9988	2475.5	21040	0.166	0.548
Para	0.1-350	Peak area	0.9994	62228	48811	0.301	0.993
		Peak height	0.9995	9815.4	12688	0.122	0.403
PPH	0.1-400	Peak area	0.9993	17907	46341	0.241	0.795
		Peak height	0.9989	1333.3	7535.9	0.092	0.304

الشكل (14): منحنيات المعايرة للعقاقير (CPM و Para و PPH) بشكل منفصل.

3- الدقة والتوافق

تمت دراسة الدقة (من حيث قيمة الخطأ النسبي) والتوافق (من حيث الانحراف القياسي النسبي) للنتائج التي تم الحصول عليها للأدوية المدروسة. تم إجراء ثلاث تحليلات مكررة (الجدول 13) لكل عقار بثلاث تراكيز مختلفة تم اختيارها من المستويات العليا والمتوسطة والدنيا ضمن مدى الخطية لمنحنى المعايرة، النتائج تشير إلى دقة وتوافق جيدة للطريقة المقترحة عند مستوى التركيز المدروس.

الجدول (13): الدقة والتوافق للطريقة المقترحة.

Drug	Injected ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Sample Conc. calculated from peak area			Sample Conc. calculated from peak height		
		Mean*	RSD %	RE %	Mean*	RSD %	RE %
CPM	10	10.493	0.060	4.936	10.506	0.060	5.060
	150	154.035	0.019	2.690	154.368	0.020	2.912
	350	351.707	0.003	0.487	349.374	0.007	-0.1788
Para	10	10.482	0.053	4.820	9.815	0.115	-1.846
	150	153.992	0.030	2.661	155.992	0.022	3.995
	350	350.911	0.001	0.260	352.578	0.007	0.736
PPH	10	10.277	0.001	2.776	9.944	0.059	-0.556
	150	151.295	0.003	0.863	151.295	0.003	0.863
	350	354.216	0.003	1.204	351.549	0.009	0.442

*Average of three measurements.

4- تطبيق الطريقة

تم تطبيق الطريقة المقترحة بنجاح لتقدير ثلاثة عقاقير أحدها مضاد للحساسية (كلورفينيرامين ماليت) والآخر يستعمل لتخفيف الألم (الباراسيتامول) والآخر يستعمل لتخفيف احتقان الأنف (فينيل فرين هيدروكلوريد)، في الأفراس المتوافرة تجارياً بالطريقة المباشرة (منحنى المعايرة) وعن طريق معادلات الخط المستقيم.

تم تحضير ثلاثة تراكيز (10 و150 و350 ميكروغرام/مل) من محلول كل عقار بواسطة التخفيف المناسب، ثم حقنها ثلاث مرات في جهاز HPLC عند الظروف المثلى التي تم اختيارها. تم حساب كمية الدواء وتم تسجيل النتائج التي تم الحصول عليها في الجدول (14). والذي يشير إلى التوافق الجيد بين النتائج وقيم الاستردادية القريبة من 100% والذي يبين نجاح هذه الطريقة لتقدير الكلورفينيرامين ماليت والباراسيتامول والفينيل فرين هيدروكلوريد في مستحضراتهم الصيدلانية وعدم وجود أي تداخل مع المضافات الدوائية.

الجدول (14): تطبيق الطريقة على بعض المستحضرات الصيدلانية الحاوية على مزيج من العقاقير.

Sample	Conc. taken ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) Of drug	Conc. calculated from peak area			Conc. calculated from peak height		
		Weight* found (mg/dosage)	Recovery %	RSD %	Weight* found (mg/dosage)	Recovery %	RSD %
Dolo-cold/ tablet (500mg Para, 10mg PPH & 4mg CPM)	2 _{of CPM}	4.098	102.4	1.660	4.203	105.0	4.757
	250 _{of Para}	499.7	99.94	0.115	502.7	100.5	0.465
	5 _{of PPH}	10.39	103.9	5.554	10.21	102.1	1.495
STOP IT/ tablet (500mg Para, 10mg PPH & 4mg CPM)	2 _{of CPM}	4.073	101.8	2.770	4.128	103.2	2.818
	250 _{of Para}	503.2	100.6	0.021	503.0	100.6	0.023
	5 _{of PPH}	10.24	102.4	1.054	10.02	100.2	1.161
HICOLD/ tablet (500mg Para, 10mg PPH & 4mg CPM)	2 _{of CPM}	4.090	102.2	2.641	4.028	100.7	2.888
	250 _{of Para}	503.0	100.6	0.021	502.8	100.5	0.023
	5 _{of PPH}	10.04	100.4	1.075	9.821	98.21	1.184
V- COLD/ syrup (125mg Para, 5mg PPH & 1mg CPM)	1 _{of CPM}	0.951	95.18	2.837	1.052	105.2	2.765
	125 _{of Para}	128.3	102.6	0.021	127.1	101.6	0.023
	5 _{of PPH}	5.17	103.4	1.044	5.06	101.2	1.149

*Average of three measurements.

5- الاستنتاجات

من خلال ما تم الحصول عليه من نتائج يتبين أن الطريقة المقترحة دقيقة وسريعة وبسيطة إذ يمكن تقدير العقاقير الثلاثة (CPM و Para و PPH) الموجودة سوية في مستحضر صيدلاني بشكل آني وبدقة عالية وبوقت قصير.

المصادر

- 1- F. Annuryanti, F. L. Yulinar, R. I. Elfadiana, I. Isnaeni, and A. Darmawati, "Comparison of UV-spectrophotometry and high-performance liquid chromatography for determination of

- chlorpheniramine maleate in tablet in the presence of tartrazine,” *J. Res. Pharm.*, vol. 23, no. 2, pp. 290–296, 2020.
- 2- K. Dibene, I. Yahiaoui, L. Yahia Cherif, S. Aitali, A. Amrane, and F. Aissani-Benissad, “Paracetamol degradation by photo-activated peroxydisulfate process (UV/PDS): kinetic study and optimization using central composite design,” *Water Sci. Technol.*, vol. 82, no. 7, pp. 1404–1415, 2020.
  - 3- Y. Yuan, D. Zhao, J. Li, F. Wu, M. Brigante, and G. Mailhot, “Rapid oxidation of paracetamol by Cobalt (II) catalyzed sulfite at alkaline pH,” *Catal. Today*, vol. 313, pp. 155–160, 2018.
  - 4- F. Horak *et al.*, “A placebo-controlled study of the nasal decongestant effect of phenylephrine and pseudoephedrine in the Vienna Challenge Chamber,” *Ann. Allergy, Asthma Immunol.*, vol. 102, no. 2, pp. 116–120, 2009.
  - 5- F. Annuryanti, F. L. Yulinar, R. I. Elfadiana, I. Isnaeni, and A. Darmawati, “Comparison of UV-spectrophotometry and high-performance liquid chromatography for determination of chlorpheniramine maleate in tablet in the presence of tartrazine,” *J. Res. Pharm.*, vol. 23, no. 2, pp. 290–296, 2020.
  - 6- M. A. Omar, K. M. B. El-Din, H. Salem, and O. H. Abdelmageed, “Development and validation of Novel Spectro-chemometric and high performance liquid chromatography methods for simultaneous determination of binary mixture of etilefrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in their bulk powders and different pharma,” *J. Mol. Struct.*, vol. 1185, pp. 92–98, 2019.
  - 7- H. Ibrahim, A. M. Hamdy, H. A. Merey, and A. S. Saad, “Simultaneous Determination of Paracetamol, Propyphenazone and Caffeine in Presence of Paracetamol Impurities Using Dual-Mode Gradient HPLC and TLC Densitometry Methods,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 59, no. 2, pp. 140–147, 2021.
  - 8- K. Palur, S. C. Archakam, and B. Koganti, “Chemometric assisted UV spectrophotometric and RP-HPLC methods for simultaneous determination of paracetamol, diphenhydramine, caffeine and phenylephrine in tablet dosage form,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 243, p. 118801, 2020.
  - 9- M. K. Abd El-Rahman, E. Fawaz, E. M. Abdel-Moety, and A. M. Abou Al-Alamein, “UPLC-PDA: A greener miniaturized tool for the analysis and purity assessment of ebastine and phenylephrine hydrochloride,” *Microchem. J.*, vol. 159, p. 105400, 2020.
  - 10- S. Sridevi, R. Vijayakumar, and C. N. Nalini, “Method Development and Validation for the Simultaneous Estimation of Ascorbic acid, Phenylephrine HCl, Paracetamol and Levocetirizine HCl using RP-HPLC,” *Res. J. Pharm. Technol.*, vol. 13, no. 4, pp. 1913–1918, 2020.
  - 11- N. G. Hussein and A. M. Saeed, “Simultaneous estimation of Chlorpheniramine maleate and Glyceryl guaiacolate in pure and capsule dosage form by using different spectrophotometric methods,” *DJPS*, 2020.
  - 12- P. Sirohi, N. Verma, and V. Sharma, “Formulation and evaluation of mouth dissolving film of Chlorpheniramine maleate,” *Eur. J. Biomed.*, vol. 7, no. 10, pp. 428–433, 2020.
  - 13- E. Dinç, Z. C. Ertekin, and N. Ünal, “Three-way analysis of pH-UV absorbance dataset for the determination of paracetamol and its pKa value in presence of excipients,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 230, p. 118049, 2020.
  - 14- K. Palur, S. C. Archakam, and B. Koganti, “Chemometric assisted UV spectrophotometric and RP-HPLC methods for simultaneous determination of paracetamol, diphenhydramine,

- caffeine and phenylephrine in tablet dosage form,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 243, p. 118801, 2020.
- 15- S. A. Zakaria, “Simple spectrophotometric method for determination of phenylephrine hydrochloride in pure and pharmaceutical forms,” *Iraqi Natl. J. Chem.*, vol. 20, no. 1, 2020.
  - 16- H. S. Alteemi and K. H. Kadim, “Colorimetric Determination of Phenylephrine hydrochloride Drug by Diazotization Reaction,” in *Journal of Physics: Conference Series*, 2020, vol. 1664, no. 1, p. 12097.
  - 17- Z. Pourghobadi and R. Pourghobadi, “Electrochemical behavior and Voltammetric determination of Chlorpheniramine maleate by means of multiwall carbon nanotubes-modified glassy carbon electrode,” *Int J Electrochem Sci*, vol. 10, pp. 7241–7250, 2015.
  - 18- S. D. Lamani, R. N. Hegde, A. P. Savanur, and S. T. Nandibewoor, “Voltammetric Determination of Chlorpheniramine Maleate Based on the Enhancement Effect of Sodium-dodecyl Sulfate at Carbon Paste Electrode,” *Electroanalysis*, vol. 23, no. 2, pp. 347–354, 2011.
  - 19- V. Katseli, A. Economou, and C. Kokkinos, “A novel all-3D-printed cell-on-a-chip device as a useful electroanalytical tool: Application to the simultaneous voltammetric determination of caffeine and paracetamol,” *Talanta*, vol. 208, p. 120388, 2020.
  - 20- J. R. Camargo, I. A. A. Andreotti, C. Kalinke, J. M. Henrique, J. A. Bonacin, and B. C. Janegitz, “Waterproof paper as a new substrate to construct a disposable sensor for the electrochemical determination of paracetamol and melatonin,” *Talanta*, vol. 208, p. 120458, 2020.
  - 21- C. A. R. Salamanca-Neto, G. G. Marcheafave, G. J. Mattos, J. T. Moraes, K. Schwarzová-Pecková, and E. R. Sartori, “Boron-doped diamond film and multiple linear regression-based calibration applied to the simultaneous electrochemical determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride, and loratadine in fixed-dose combinations,” *Microchem. J.*, vol. 162, p. 105831, 2021.
  - 22- A. R. Mahdi, S. T. Ameen, and Y. K. Al-Bayati, “Preparation of New Molecularly Imprinted Polymers and its Use in The Selective Extraction For Determination Phenylephrine Hydrochloride at Pharmaceuticals,” *Int. J. Drug Deliv. Technol.*, vol. 9, no. 4, pp. 651–659, 2019.
  - 23- J. W. Dolan, “How much can I inject? Part I: injecting in mobile phase,” *LC GC NORTH Am.*, vol. 32, no. 10, pp. 780-785, 2014.
  - 24- D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis Seventh Edition*. Cengage learning, 2017.
  - 25- E. Grushka and N. Grinberg, *Advances in Chromatography, Volume 50*. CRC Press, 2019.
  - 26- J. Wysocki, “What drives a separation-the stationary phase or the mobile phase?,” *LC GC NORTH Am.*, vol. 19, no. 11, pp. 1150–1159, 2001.
  - 27- K. Chandrul Kaushal and B. Srivastava, “A process of method development: A chromatographic approach,” *J. Chem. Pharm. Res.*, vol. 2, no. 2, pp. 519–545, 2010.
  - 28- R. O. Hassan, “Simultaneous determination of some water-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by IP RP-HPLC,” 2001.
  - 29- S. Moldoveanu and V. David, *Essentials in modern HPLC separations*. Newnes, 2012 .
  - 30- I. D. Wilson, *Encyclopedia of separation science*. 2000.

Development of high-performance liquid chromatography using simplex method for the simultaneous determination of some decongestant drugs

Mumin F. Hamad Al-Samarrai ^{1*}, Emad T. Hanon ¹ and Ali I. Khaleel ²

1- Department of Chemistry, Collage of Education, University of Samarra· Iraq (believerpc@uosamarra.edu.iq)

2- Department of Chemistry, Collage of Education, University of Samarra· Iraq

3- Department of Chemistry, College of Science, University of Tikrit· Iraq

Article Information

Received: 10/06/2021

Accepted: 20/07/2021

Keywords:

development of high-performance liquid chromatography method, simplex method, simultaneous determination and decongestants.

Abstract

Using high-performance liquid chromatography method, three decongestant drugs, chlorpheniramine maleate (CPM), paracetamol (Para) and phenylephrine hydrochloride (PPH) were quantitatively determined in pharmaceutical preparations. Using two methods. In both methods, isocratic displacement and a mobile phase consisting of (acetonitrile: a buffer solution consisting of 0.01 M dipotassium phosphate and monopotassium phosphate), a temperature of 38 °C, a wavelength of 228 nm, a volume of injected substance 20 µl, and a separation column of NUCLEODUR®. C18 (250 x 4.6 mm id) ec were used, In the first method (univariable method), it was found that the pH function was 7.8, the flow rate was 1.0 ml/min and the mobile phase ratio was 50:50 acetonitrile: Buffer solution), In the second method; the multivariate method (simplex method), it was found that the best pH function is 7.7 and Flow rate 1.0 ml/min and the mobile phase ratio 48:52 (acetonitrile: Buffer solution), and the results were close, as the retrieval was (95.18 -105.00) with a detection limit and a quantitative limit (0.092 -0.301 mcg/ml) and (6.440 -2.107 mcg/ml) respectively.